

図5 LBM標準サンプルセット (Liver-Brain Mix) によるシステムの定量性の検定とデータ直接変換式の生成

LBMの5サンプルをAffymetrix社 GeneChip® (MOE430v2) および、Amersham社 CodeLink アレイ (GSCが測定可能な試作品) にて測定した。ここでは、共通に測定された8遺伝子 (AffymetrixのIDにて表示) を示す。上段は、細胞1個当たりのコピー数で表示したもの。下段はLBM (50 : 50) の値に対する比を表示したもの (理想的には、すべての遺伝子が50 : 50のところを1を通り100 : 0におけるy切片が0~2の範囲に収まる直線を描く)。個々のprobe setには若干の性質の相違があるが、押しなべて直線性がよく、2社間のデータの相互直接変換関数が求められる。別途に真のコピー数が判明した際 (定量PCRなどにより) には、その値をもとに過去のマイクロアレイ・データを一括変換することが可能となる

時間依存的データ3次元表示では45,000枚の局面の層状集合体からなる「多層構造からなる菓子などになぞらえミルフィーユ・データ [millefeuille (MF) data] と名付けた」。このMF dataは1局面の各格子点が3匹の動物に由来する3つのデータにもとづいており、格子点のデータの信頼性の評価、artifactの除去や、生物学的な蓋然性を有する変化であるか否かの判別に適しているうえに、類似の用量・時間反応を示す遺伝子の選別に威力を発揮する。

生体反応の分子メカニズム解析 (カスケード解析) を目標に、遺伝子欠失動物の活用を見込んで、マウスを用いた実験を重ね、2004年6月現在で約25の既知化合物についてのデータ収集を終え、向こう2年の内に90化合物のデータを蓄積する予定である。まずはすべての遺伝子が平等に重要と考える方策を取るため、生物学者が視覚的に確認できるMF dataを利用した完全な教師なし (unsupervised) クラスタリングを開発・実施している。[NTTコムウェア株式会社

1つの化合物のデータは約45,000 probesetの曲面からなる
(MOE430 v2 GeneChipの場合)

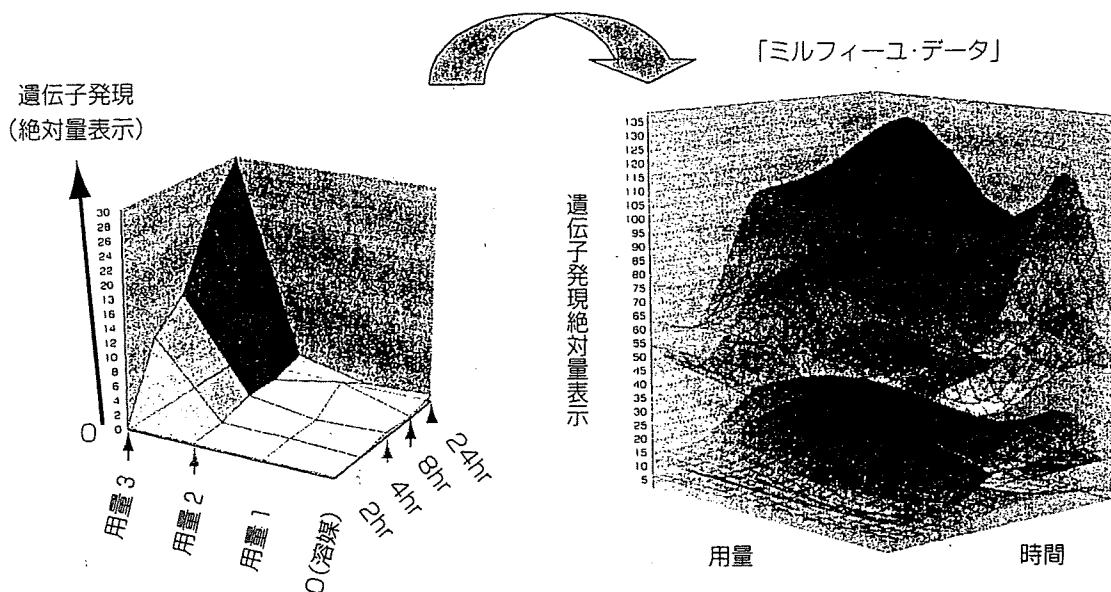


図6 トキシコゲノミクス・プロジェクトにおける単回投与実験の基本構成とミルフィーユ・データ

時間と用量の組合せからなる4×4のマトリックス構造のプロトコルを示す。各群3匹、サンプルはプールせず個別にGeneChip[®]解析を実施している。X軸に用量、Y軸に時間、Z軸に発現量（ゼロからの均等目盛り表示）をプロットすることにより、1つのプローブセットごとに1枚の発現局面を描くことができる。現在使用中のMOE430v2は約45,000のプローブセット情報を生産するため、1つの化合物のトランスクリプトーム情報は45,000枚の局面の集合体（ミルフィーユ・データ）であらわされる。→巻頭カラー²参照

と共同開発し、Teradata（日本NCR株式会社）による解析・データベース上に搭載した。このクラスタリング手法は、クラスター数を指定せず、45,000プローブセット（MOE430v2）を小さいクラスターから数百のクラスターに分類する。複数の化学物質からのクラスターデータの解析と、適切な遺伝子欠失マウスによるMF dataにより、客観的な遺伝子カスケードの描出を試みている。これと既知の情報との比較を行い、必要に応じて不足部分の確認実験を別途追加して実施し、最終的に信頼性の高い遺伝子カスケードデータベースの構築と、これにもとづいた効率的で正確な毒性評価・予測技術の開発を目指している。

〈謝辞〉

本システムの開発とプロジェクトの遂行に当たり、当毒性部の諸先生方および安東朋子、森山紀子、近藤優子、中村祐子、安部麻紀、吉木健太、松田菜恵、森田紘一、今井あや子、青柳千百合、相原妃佐子の各氏に深く感謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H13-生活-013、H14-トキシコ-001およびH15-化学-002による。

参考文献

- 1) Ema, M. et al. : J. Biol. Chem., 269 : 27337-27343, 1994
- 2) Jacobson, J. L. & Jacobson, S. W. : Neurotoxicology, 18 : 415-424, 1997
- 3) Jacobson, J. L. & Jacobson, S. W. : Obstet Gynecol Surv., 59 : 412-413, 2004
- 4) Waters, M. D. et al. : Mutat. Res., 544 : 415-424, 2003
- 5) Hill, A. A. et al. : Genome Biol., 2 : RESEARCH0055, 2001
- 6) van de Peppel, J. et al. : EMBO Rep., 4 : 387-393, 2003
- 7) Hekstra, D. et al. : Nucleic Acids Res., 31 : 1962-1968, 2003
- 8) Sterrenburg, E. et al. : Nucleic Acids Res., 30 : e116, 2002
- 9) Talaat, A. M. et al. : Nucleic Acids Res., 30 : e104, 2002
- 10) Bolstad, B. M. et al. : Bioinformatics, 19 : 185-193, 2003
- 11) Lee, P. D. et al. : Genome Res., 12 : 292-297, 2002
- 12) Wilson, M., et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 12833-12838, 1999

SR

ゲノム毒性学
形質非依存型トキシコゲノミクスの導入

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 小野 敦 中津則之

別刷

秀潤社
細胞工学
CELL TECHNOLOGY
Vol.23 No.6 2004

Special Review

ゲノム毒性学
形質非依存型トキシコゲノミクスの導入

Toxicology in Genome Age: Introduction of Phenotype-independent Toxicogenomics

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 小野 敦 中津則之

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Atsushi Ono, Noriyuki Nakatsu

形質非依存型トキシコゲノミクスに適用するため、マイクロアレイから細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る方法 (percellome)を開発した。これにより遺伝子発現量を、ゼロを起点とする均等目盛で表示し直接比較することができるようになった。そのため、今まで用いられてきたコントロールに対する比率表示と違って、割り算をする必要がなく、発現値ゼロの表示が自由に行え、コントロール群も処置群も同列に表示することが可能となった。また、さらなる標準化操作が原則的に不必要なため、測定したすべての遺伝子についてマイクロアレイ間はもとより、実験間での直接比較が行える。この特長は、生物学者が内容を直感的に把握しやすいようなデータの可視化にも役立ち、その後のデータ解析とインフォマティクス形成を促進することが示されつつある。異なったプラットフォーム間でのデータ互換にも拡張可能であり、トキシコゲノミクスに必要な大型データベースやコンソーシアム構築にも貢献する可能性が高い。

key words

マイクロアレイ技術, トキシコゲノミクス, 分子毒性学, 創薬支援, 化学物質安全性評価

1 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了, 医学博士(人体病理学, 実験病理学専攻)。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て, 2002年より同部長。内分泌かく乱関連などの分子毒性学研究, トキシコゲノミクスプロジェクトなどを所掌業務との有機的連携のもとに推進。

相崎健一, 五十嵐勝秀, 小野 敦, 中津則之 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

はじめに

生物界 (biosphere) は化学物質界 (chemosphere) との相互作用の中で存在している。食べ物も薬も毒も、経口、吸入、あるいは皮下や血管内へ進入してきて生体分子と相互作用を起こす。この関係は、食物を選ぶ過程で例えば毒のあるものを避け、薬草を見いだすなど太古の昔から存在しているが、近代生活においてその複雑さが急速に増してきた。体内への直接的な摂取を目的としたものに加え、生活の利便性のために開発・利用される物質の増加が国民の安全と安心に係る問題として注目されている。しかし、それらの規制決定に係る毒性評価を生体側から見ると、身体に入らなまでの“物質の分類”はもはや重要ではなく、むしろ身体に入った後にどのような反応がいかに惹起されるかが問題となる。

創薬の世界では、薬効のある物質を見つけ出すことが重要であり、次いで、その毒性が検討される。つい最近までは、“アマゾンに新しい植物を探しに行く”ことが主流であったが、近年は“何十万ものリード化合物のライブラリー”を充実させ、目的とする薬効を発揮する物質を、目的に合った方法でスクリーニングする方策がとられる。“薬”の毒性は、概念上、薬効の延長線上の毒性 (例えば過剰イン

シュリンによる低血糖) と予期せぬ副作用 (まさしく “side effect”) とがある。いずれにせよ、“薬”については cost-benefit (費用便益・費用対効果) の概念が強く働き、多少の毒性があっても使用することが少なくないし、患者側からの要望があればなおさらである。

本稿では、cost-benefitの対象を人 (ヒト) に限定して話を進める。ヒトにおける毒性を検討するためには、ヒトからの情報が一番正確なことは言うまでもない。薬の開発の過程では、“臨床試験”なる“人体実験”が可能である。もちろん、ヒトに使っても薬効のもたらす利益よりも副作用たる毒性が十分に小さいであろうことを、各種の動物実験によって確かめてから、厳重な管理体制のもとで、かつ本人の了解を得たうえで“人体実験”に入るわけである。この場合の毒性には、用量作用関係の概念が乏しい。すなわち、実際に薬として投与するときの薬用量において、どのような毒性 (副作用) が現れるかが、最大の焦点なのである。この貴重な人体実験でわざわざ生死に関わるような大量投与を行うことはない。また、薬効が期待できないような微量の投与も当然行わないわけである。

これに対して、いわゆる化学物質、例えば、家庭用品、工業製品、食品添加物などの現代生活の利便性に欠かせない物質に由来する化学成分の体内への侵入に対しては、一般

的に cost-benefit の概念が弱く働き、可能ならばゼロにしたという傾向がある。しかし、“完全ゼロ”は使用する限り基本的には不可能であるので、どのくらいの量までなら安全と見なせるかを検討することが行われてきている。

これらの物質については、人体実験が倫理的にも現実的にもできないと考えるのが通常である（ボランティアを募ることができれば、それは可能かもしれないが、発癌性が疑われたり、蓄積性が高いもの、例えばダイオキシンやPCBのようなものは、いくらボランティアが名乗り出てくれても投与させてもらう気にはならないものである）。なお、薬でも“人体実験”が事実上できない対象がある。それは、胎児と子どもである。いずれの場合も、現在のところ、ヒトの身代わりとしてモデル動物を用いることになる。

I. 毒性における量と質の問題

では、どのくらいの量までなら安全と見なせるか。多量に摂取すれば毒性は強く、少量になれば毒性は弱まるという大原則（毒性は用量に関して単調増加する）のもとでは、“毒性に閾値がある”と考えられる場合と、“閾値が存在しない”と考えられる場合とで、扱いを分けている。前者の場合は無毒性量あるいは無作用量をラットなどの実験動物で求め、種差や個体差を勘案した係数（不確実係数あるいは安全係数と呼ぶ）で割って、安全の目安となる基準値とする。後者の場合は、無毒性量の代わりに、俗に“運悪く雷に打たれて死ぬ確率”を目安とする実質安全量（virtually safe dose, 通常 10^{-5} ないし 10^{-6} の危険率を適用）を採用し、同様の手続きを経てヒトへの外挿を行っている。これらの判断が正しいか否かを検討する材料としてはヒトでの中毒事例、自殺事例、事故事例やそれらに関する疫学調査が活用され、それに基づく基準設定法の修正が折に触れて加えられてきた歴史がある（他方、化学物質の輸送や取り扱いに際した注意度を定めるために、毒物・劇物の指定が行われているが、これは、ラットなど単回曝露時のLD₅₀（半数致死量；動物の半数が14日以内に死亡する量）が低値のものを“危険度が高い”として規制するものである）。

それでは、毒性の質的な問題はどのように取り扱われてきたか。生物学が現象の記述学に基礎を置いていた段階での毒性学は、創薬の場にしろ、一般的な化学物質の毒性評価の場にしろ、その要求される役割を果たすために、投与された化学物質と症状との関連性に基づいた化学物質の体系化を基盤として発達してきた。その過程での様々な経験を取り入れる形で、前述の“不確実係数”や“LD₅₀”の概念が利用され、現在まで、非常に有効に機能してきている。ここまでの毒性学は、化学物質の投与とそれによる症状発現（毒性）の関連性をブラックボックスを介して分類し体系化する

るものであり、回帰モデル（regression model）の概念に根差した後向きの検討が行われることが多かった。しかし、サリドマイド禍（奇形発生）に代表されるようにげっ歯類の実験動物では毒性が確認されず、ヒトに使用して初めて催奇形性が明らかになった事例の存在は、この方法の限界を示している。

近年、科学の進歩により、毒性学は生体内で引き起こされる反応の分子レベルから形態レベルまでメカニズム記述を基礎とするものへと変貌しつつある。ここで、活躍するのがハイスループット性の高いマイクロアレイ技術である。しかし、マイクロアレイから得られた遺伝子発現プロファイルによる検討も、依然としてブラックボックスが介在している場合は、その時に観測される毒性形質と関連付け、いわゆる化学物質のフィンガープリント（指紋）として毒性反応の類型化を行うことが多い。このような関連付けを“phenotypic anchoring”と呼ぶことがある¹⁾。

II. 形質非依存型トキシコゲノミクス (phenotype-independent toxicogenomics)

これに対して、分子毒性学の立場から一番知りたいことは、生体内で実際に起こっている一連の事象であり、トランスクリプトーム (transcriptome) の場合にはすべての遺伝子の情報をもとにした遺伝子カスケードの全容解明である（図1）。これがわかれば、膨大な時間と費用の掛かる長期毒性試験（ラットなどを用いる）の代替として、より早く、安く、正確な評価、種差や個人差を勘案した正確なヒト毒性予測が可能となることが強く期待される。特に胎児、新生児、小児、成人、老人の各発達段階における生体側の反応様式・感受性の変化や、複数の物質の進入による複合作用なども包括的に扱えるようになると考えられる。すなわち、実験動物で得た所見をヒトに外挿する際に、実験動物のブラックボックスとヒトのブラックボックスを繋げる経験則が“不確実係数”であるが、これを責任遺伝子カスケードの解明によってバイパスする方策を得ることになる（図2）。これを実現させるためには、例えば、マウスにおいては遺伝子ノックアウト手法により遺伝子ごとの機能解析が可能であり、ヒトではSNPs解析が同様に利用できる。しかし、形質発現が伴わない場合には解析が行き詰まることが多い点で、これらは形質発現に依存的な手法である。全ゲノムが明らかになった現在、この目的のためには形質発現の有無にかかわらずすべての遺伝子の発現をモニターすることを目的としたアプローチを考慮せざるをえない。

さらに、創薬における毒性分野への要求の1つに、副作用による臨床段階での開発中止例、あるいは市販後の販売中止例の減少が挙げられる。すなわち、“動物実験では毒性が

図1. リンケージからカスケードへ

生物学が現象の記述学に基づいていた段階での毒性学は、投与された化学物質と症状との間に介在するブラックボックスを挟んでの、それらの関連性に基づいた体系化が行われてきた。しかし、分子毒性学の立場から一番知りたいことは、生体内で実際に起こっている一連の事象であり、トランスクリプトームの場合にはすべての遺伝子の情報をもとにした遺伝子カスケードの全容解明である。毒性学的に重要なマーカー遺伝子(数十~数百のことが多い)についてのこのようなデータベースは存在するが、ここではすべての遺伝子を対象としたものを指向する。

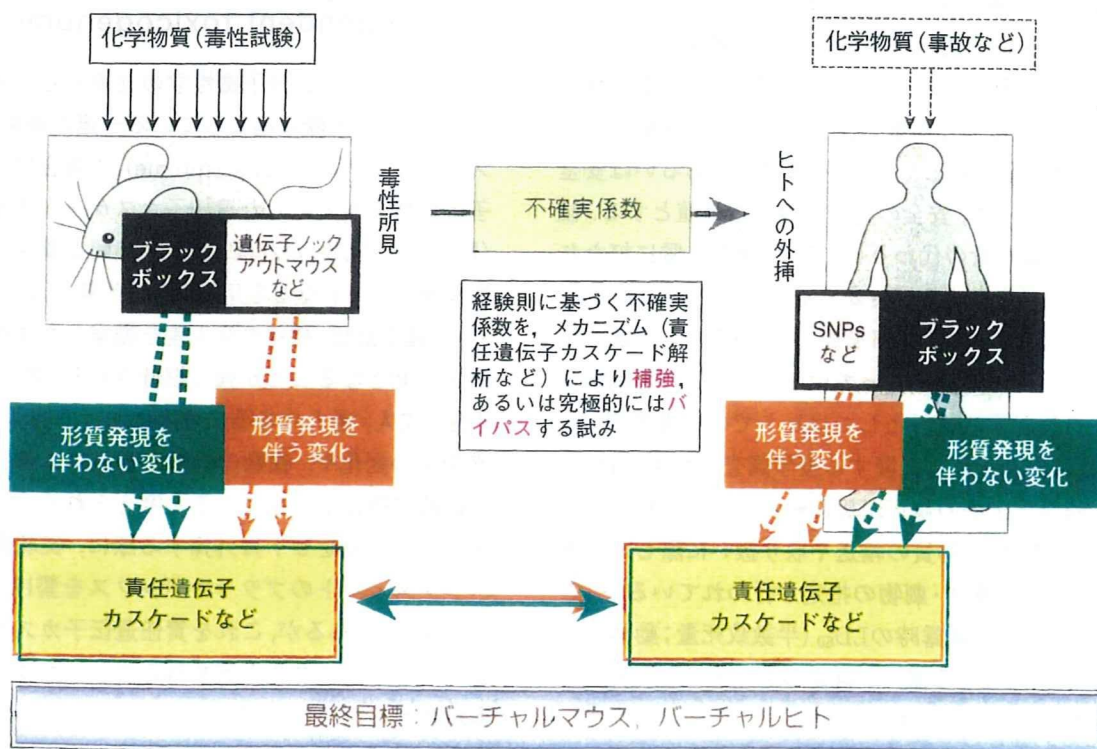
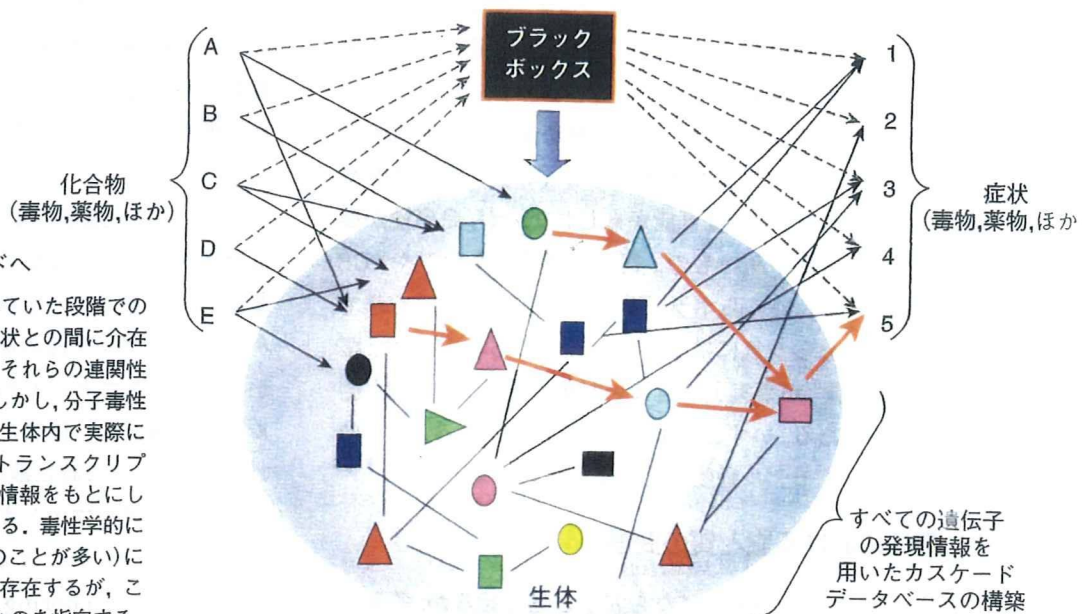


図2. 毒性評価法への分子毒性学の導入

毒性学の近代化のための分子毒性学の導入は、実験動物のブラックボックスとヒトのブラックボックスを繋げるために採用されている経験則ベースの“不確実係数”を、何らかのメカニズム解析により補強、あるいは究極的にバイパスすることを目的とする。その際、ブラックボックスの解明手段には例えば遺伝子ノックアウトマウスやヒトにおけるSNPs情報が活用できるが、いずれも形質発現を伴う場合にのみ有効に働く。形質発現と結び付かない部分については、網羅的な情報収集を行わざるをえないと考える。

なかったことから臨床試験に進んだところ、ヒトで毒性が現れ、開発中止となった。そのために何億円もの経費が無駄になった。このような事態を回避せよ”, 言い換えると、動物で所見がなくともヒトでの毒性を予測することが要求されているわけである。サリドマイドはマウスには目に見え

る変化を起こさないかもしれないが、血管新生や免疫修飾など、種々の作用が誘導されることが報告されている。これは、マウスでは形質発現が明らかでなくとも、ヒトへの影響を予測する方策の存在の可能性を示している。

また、恒常性維持機構に深く関わる内分泌かく乱化学物質

の問題など、外界からの影響が効率良く中和されてしまい、形質変化がモニターしにくい対象を扱う場合にも、形質発現の有無にかかわらず mRNA やタンパク質の発現修飾を観測することが有効な影響解析手段となることが考えられる。

このように、今後の毒性学におけるトランスクリプトーム解析、すなわちトキシコゲノミクス (toxicogenomics) は、従来の“形質依存型”のものから“形質非依存型 (phenotype-independent)”に発想を転換する時期に来ていると言える。

Ⅲ. 形質非依存型トキシコゲノミクスの条件

形質依存型では、ある特定の毒性所見にリンクした遺伝子をマーカーとして選択し、それが毒性発現に重要であると認定することから始まる。これに対して、形質非依存型トキシコゲノミクスの特徴は、まずは形質発現情報などの情報を用いずに、自らの遺伝子発現プロファイル情報のみを頼りに遺伝子発現変化の解析を開始しようとする点にある。すなわち、ある毒性所見にリンクしたマーカー遺伝子を認定できないので、測定するすべての遺伝子はどれも平等に重要であると仮定する必要がある。そして、そのすべてがどれだけ発現増加したか、減少したか、あるいは不変であったかを正確に観測する必要がある。さらに、幾多の化学物質を検討した結果初めて全体像が明らかになるため、複数の実験の結果を長きにわたり集積し、それらのデータを縦横に解析する必要がある。

この条件を満たすためには、今までのマイクロアレイ手法には問題があった。まず、マイクロアレイの性能として、mRNA の測定可能な範囲が比較的狭いために1枚当たり用いる総 mRNA 量を一定量に揃える必要があった点である。これは mRNA が少な過ぎると蛍光シグナルが弱いためデータが得られず、多過ぎると蛍光シグナルが飽和してしまっただけで定量性の良いデータが得られない事態を回避するための措置である。この場合、サンプル中の細胞1個当たりの mRNA の絶対的な多寡に関する情報は消失してしまう。このような相対的な情報でのサンプル間の mRNA 発現の比較のために、種々の標準化手法が編み出されている^{2)~10)}。原則的には、統計学的な有意差検定をもとにした変動遺伝子の抽出が行われる。このような計算に際しては、大半の遺伝子はサンプル間で不変であるとの前提が必要であり、その結果、多数の遺伝子が“変動したとは言えない”と位置付けられることとなる。また、変動の大きさを表現するためにコントロール群のサンプルに対して何倍変化したかを比率表示することが多い。この場合、コントロール群のサンプルでほとんど発現していない遺伝子は表示が困難となるばかりでなく、異なる時期に実施した複数の実験を比較する際

に、コントロール群の実験間変動を吟味する情報が消失してしまうという問題が加わる。

Ⅳ. Percellome とミルフィーユ・データ (millefeuille data)

このような問題を解決し、形質非依存型トキシコゲノミクスに適用するため、筆者らは、細胞1個当たりの mRNA 絶対量を得る方法 (Percellome) を、当時それに必要な条件を満たしていたアフィメトリクス社の GeneChip を対象に開発した (特許出願中、投稿中)。このシステムは大きく4つの要素から成っている。第1に RNA 用に準備したサンプル破碎液のごく一部からその DNA 濃度を簡便に測定する方法、第2に用量関係を考慮し工夫されたスパイク RNA 液の調製と、その破碎液への添加法、第3に Hill 式に基づいた絶対化アルゴリズム、そして第4に、マイクロアレイの用量相関性能の検証や、バージョンが異なるマイクロアレイ間のデータ変換、ひいては、異なったメーカーのマイクロアレイ間のデータ変換に用いる標準サンプルセットとデータ変換アルゴリズムである。Percellome データは細胞1個当たりの絶対量であるので、各遺伝子の発現量をゼロを起点とする均等目盛りで表示し直接比較することが可能である。今まで用いられてきたコントロールに対する比率表示と違って、割り算をする必要がないため、発現値がゼロの場合の表示が自由に行えるうえ、何よりも、コントロール群も処置群も同列に表示することが可能となった。また、さらなる標準化操作が不必要であるため、測定したすべての遺伝子について、マイクロアレイ間はもとより、実験間の直接比較が可能となった。データを可視化することが非常に容易になったため、生物学者がその内容を直感的に把握しやすくなり、その後のデータ解析とインフォマティクス形成に大きく貢献することが示されつつある。これらの機能は複数の実験からの結果を長きにわたり蓄積する必要があるトキシコゲノミクス研究には重要なことである。また、後述するように異なったプラットフォーム間でのデータ互換にも拡張可能であり、共通の大型データベースやコンソーシアム構築にも貢献する可能性が高い。

1. 方法の概略

(1) DNA 測定

細胞1個当たりの mRNA 情報を得るために、サンプルを構成する総細胞数を測定する。実際に細胞数を計測することは特に実質臓器の場合には困難なため、その代替指標として、細胞核内のゲノム DNA 量を用いる。サンプルを DNA 測定専用消費することを避けるため、RNA 調製用の組織破碎液のごく一部 (通常、10 μ l) を DNA 測定に用いるプロ

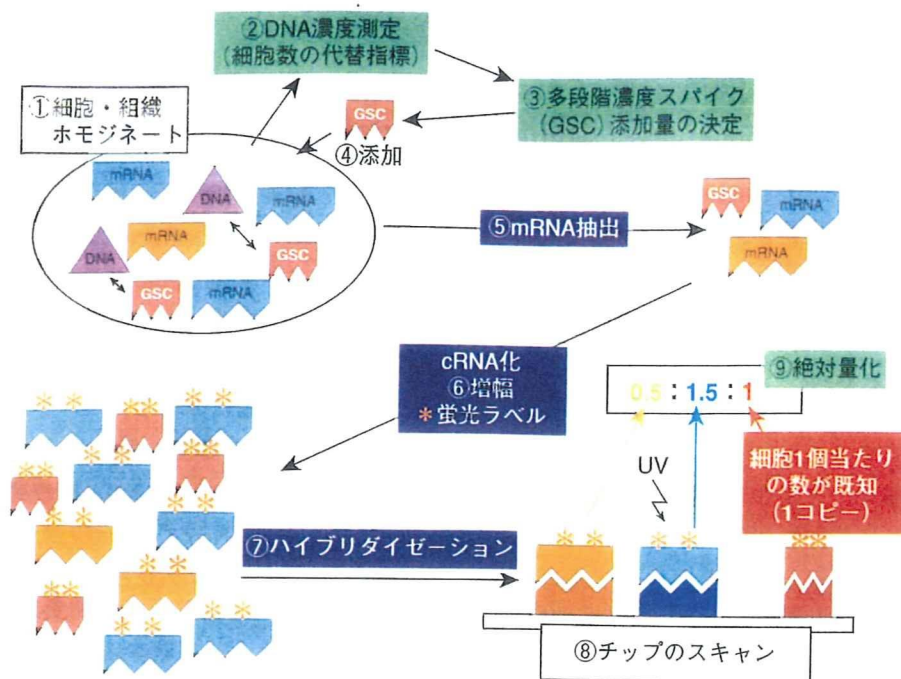


図3. 絶対量化の概略

絶対量化の原理は、①のサンプル・ホモジネートの細胞数をDNA量としてとらえ、細胞個数に比例した量の多段階濃度スパイクRNAカクテル (dose-graded spike cocktail ; GSC) を添加する (②~④)。その後の⑤~⑧は通常の手順を踏む。⑧におけるGSCのシグナルが細胞1個当たりの既知コピー数を示している。測定したいサンプル中のmRNAの細胞1個当たりのコピー数はGSCのシグナル強度との比較から求めることができる (⑨)。GeneChipにおいては④のRNA濃度と⑧の蛍光強度の関係がHill式で記述できることを確認しており、それをを用いた変換式により測定されたすべての遺伝子についてサンプルの細胞1個当たりの絶対量が導き出される。緑の囲み：本法で追加された手順、青の囲み：アフィメトリクスのプロトコル手順。

トコールを確立した。

(2) 多段階濃度スパイクカクテル (dose-graded spike cocktail ; GSC)

細胞1個当たりのmRNAの標準として、組織破碎液に添加するスパイクRNAには、アフィメトリクス社のGeneChipが使用者のために用意していた5種類の枯草菌由来遺伝子のRNAを用いた。5種類の枯草菌RNAを各々約2,000塩基の長さに合成し、5段階の用量に配合したカクテルを作製した。これにより、広い濃度範囲をカバーする標準用量作用曲線をすべてのサンプルに導入することが可能となった。

(3) 絶対量化プログラム

アフィメトリクスGeneChipにより、蛍光シグナルとmRNA量との間にHill式に従う関係が成立することを後述のLBM標準サンプルなどにより確認した。その結果から、Hill式の直線化式によりGSCを直線化して絶対量化を行う変換アルゴリズムを開発し、それを自動実行するプログラムを独自に開発した。

(4) GeneChipの用量相関性確認およびバージョン間・プラットフォーム間データ変換対応のためのLBM (liver-brain mix) 標準サンプルおよびデータ変換アルゴリズム

遺伝子発現プロファイルが大きく異なる一対の組織を一定の比率で相互に希釈し合ったサンプルセットを表記の目的のために用意した。具体的には、肝と脳を用い、100:0, 75:25, 50:50, 25:75, および0:100の混合比の5サンプル

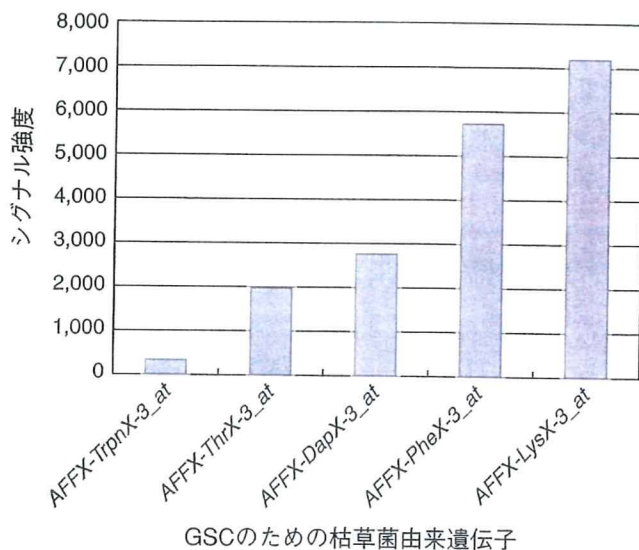


図4. 多段階濃度スパイクRNAカクテル (GSC)

GSCはグラフに示すように、低い値から高い値まで幅広い領域をカバーするように5種類の枯草菌mRNAを合成して5段階の濃度に混合したものである。これを適切に添加することによりすべてのサンプル中に細胞1個当たりの指標とmRNA検量線を導入している。その結果GeneChip1枚ごとのデータの歪みを検出することが可能となり絶対量化の精度を格段に高める結果となっている。また、同様の理由で新旧のバージョン間や異なったプラットフォーム間のデータ変換の際にも、標準曲線として有効に機能する。

ルから成るセットを用意した。

2. 絶対量化の原理

基本的原理は、サンプルの細胞数 (ゲノムDNA濃度で代

替)に比例した分子数のスパイクRNAを添加することで、サンプルの細胞当たりのmRNA絶対量(コピー数)の指標をサンプル中に導入するものである(図3)。ただし、スパイクRNAは1点を規定するものではなく、5種類の枯草菌遺伝子に対するRNA(哺乳類の配列と交叉しない)を適切な公比を持たせて5段階の濃度に割り振ったカクテルとして用いることが特徴である(図4)。これにより、絶対コピー数の指標となると同時に、広い用量範囲について検量線を各サンプルに導入したことになり、mRNA抽出からGeneChipの蛍光測光までの過程で生じるデータ全体の歪みを補正する際に威力を発揮するとともに、すべてのGeneChipの発現値を統一基準下で安定的に絶対量化する効果を有している。サンプルに由来するすべての測定値はHill関数の直線化式により直線化されたGSC検量線に基づいて絶対量に変換される。

$$\text{Log}(S/S_{\text{MAX}} - S) = \gamma \log C - \gamma \log SC_{50}$$

式中、Sは測定値、 S_{MAX} は最大測定値、CはスパイクRNAの濃度、 SC_{50} は50%反応濃度、 γ はHill係数を示す。なお、高発現側の歪みを気にしない場合には、 S_{MAX} を無限大に置いた近似式での代用が可能である。

1例として、スキャナーを取り替えた際のデータの歪みを矯正した事例を紹介する(図5)。複数のサンプルの間での、あるいは複数の実験間でのある遺伝子の発現変動の比較は本システムにより飛躍的に向上することが示されている。例えば、日内変動遺伝子の日内変動が絶対表示により直読

可能であり、その発現様態は発現値をも含めて実験間で再現されている。

他方、チップ内での異なる遺伝子の発現量の正確さに関しては、GeneChipのプローブセットの設計に依存する。アフィニティメトリクスはプローブの設計に際してそれらの t_m 値を一定に保つアルゴリズムを用いている。これについては、利用者として個々に定量的PCRなどにより検証する必要がある。

V. LBM

1. システムの定量性の検定

LBMは当方の便宜上、肝と脳の組み合わせを用いたが、遺伝子発現プロファイルの異なるペアであればどのような組み合わせでも利用可能である。複数のペアを併用すればさらに精度の良い検定が可能となる。GSCをDNA濃度に応じて添加したLBMセットを測定し、絶対量化した結果は、グラフ化すると直線を描くはずであり(図6)、さらに50:50のサンプルで除した場合、理想的にはすべての遺伝子が50:50のところまで1の値をとり、100:0あるいは0:100では0から2の間の値をとるところの直線を描くはずである。この結果から、マイクロアレイの定量性が確認される。

2. GeneChipの新旧バージョン間のデータ変換

さらに、このようなLBMサンプルをバージョンアップ前の古いGeneChipと新しいバージョンのGeneChipで測定し

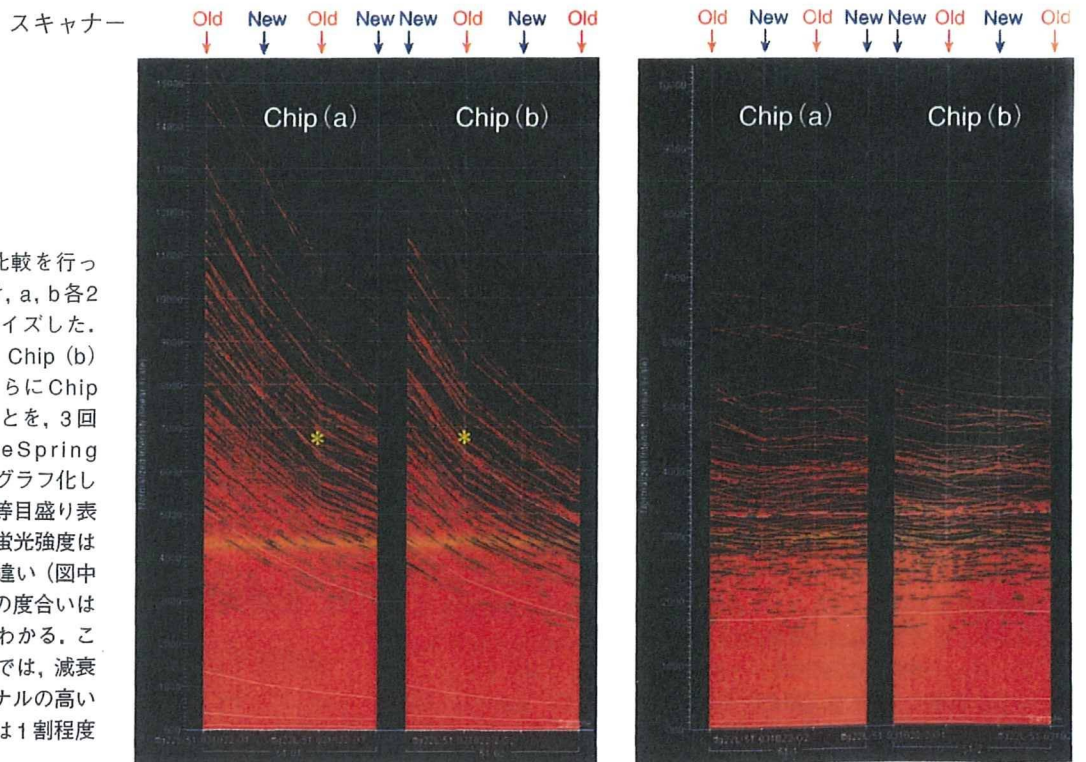


図5. 絶対量化の効果の1例

新旧2台のスキャナーの特性比較を行った。1つのサンプルを2つに分け、a, b各2枚のGeneChipにハイブリダイズした。Chip (a)を新スキャナーにて、Chip (b)を旧スキャナーにて測定し、さらにChipを取り替えて再スキャンすることを、3回繰り返した。その結果をGeneSpring (Silicon Genetics社)を用いてグラフ化した(縦軸はゼロを起点とする均等目盛り表示)。スキャンを繰り返すたびに蛍光強度は減衰してしまう。傾斜の角度の違い(図中*の部分の角度参照)から減衰の度合いは旧スキャナーで若干強いことがわかる。このデータを絶対量化したデータでは、減衰がほぼ完全に補正される(シグナルの高いところでも、値の相対的な振れは1割程度に収まっている)。白線はGSC。

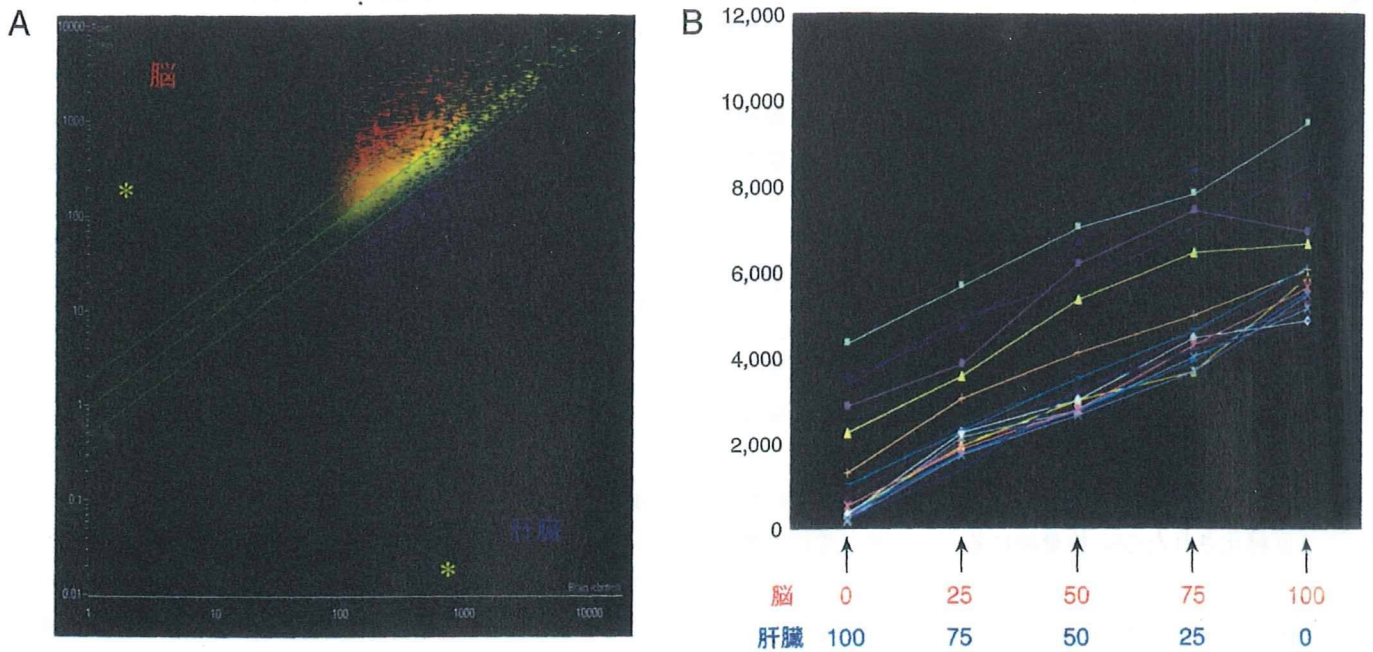


図6. LBM (liver-brain mix) 標準サンプルセットによるシステムの定量性の検定

Aのスカッターグラフが示すように脳と肝臓では発現遺伝子のレパートリーが大きく異なり、X軸およびY軸に沿って遺伝子が線状に並ぶ(*)ことでわかるとおり、片方の臓器にのみ発現する遺伝子が多い。このような臓器の対からサンプルを調製し、100:0, 75:25, 50:50, 25:75, および0:100の混合比の5サンプルをGeneChip (MG-U74v2A) にて測定するとBのように、ほぼ直線を得る。すべての遺伝子について50:50の値に対する比を求め、同様にグラフを描くと、理想的な性能を有するマイクロアレイではすべての遺伝子が50:50のところを1を通り、100:0におけるy切片が0~2の範囲に収まる直線を描く。

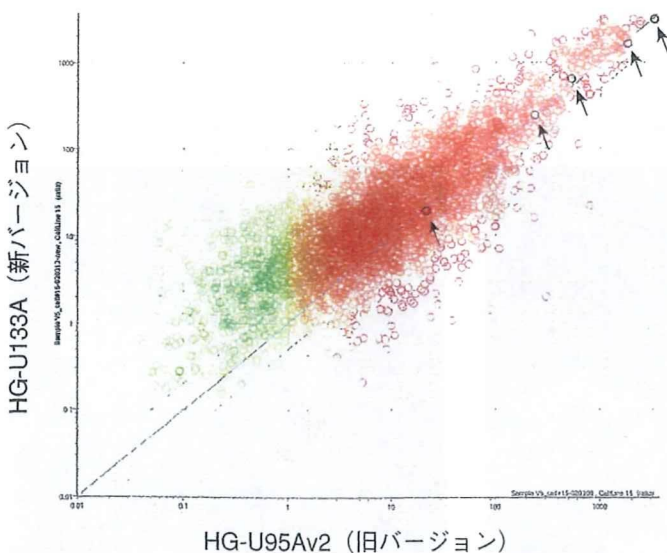


図7. GeneChipの新旧バージョン間のデータの関係

LBMサンプルセットを新旧のバージョンのGeneChipにおいて測定すると、ここにスカッターグラフで示すような関係が5組得られる。矢印で示す黒丸がGSCである。GSCを基準に新旧のChipでの発現値が標準化され、そのような点が5組のデータから5点得られることから、ここにプロットされた遺伝子(両バージョンに同一または対応するアノテーションが得られ、かつ、LBMサンプルに発現されているもの)については個々について直接変換式が得られる。これは、条件により定量PCRやアフィメトリクス以外のマイクロアレイプラットフォームにも原理的に拡張可能である。

ておくことにより、LBMに含まれるすべての遺伝子について、5点から成る新旧のチップにおける用量相関関数を求めることができる。LBMに他の臓器の組み合わせを用いることで取り扱える遺伝子数を増やすことが可能である(図7)。

3. データ互換性の他システムへの拡張

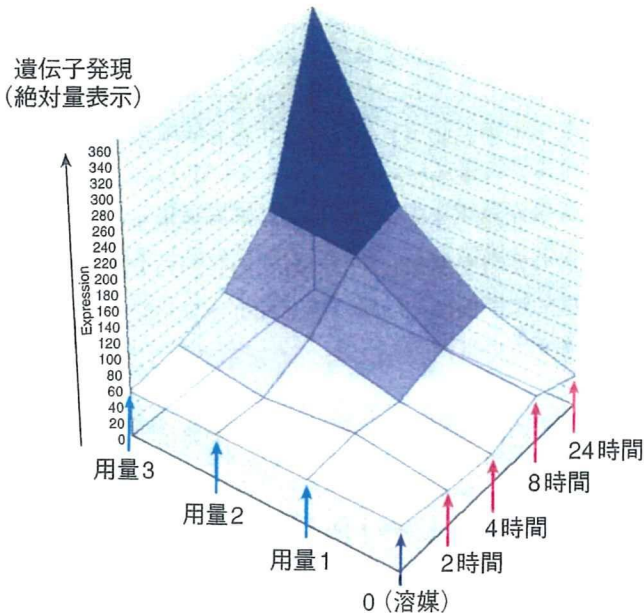
本システムのGSCを添加したサンプルはスパイクRNAを検出するプライマーセットを用意することでPCRにおいても容易に絶対量データを得ることができる。詳細は他に譲るが、プライマーペアの増幅効率のばらつきを勘案した絶対化アルゴリズムとともにPercellome定量PCRシステムを構築中である。アフィメトリクスGeneChip以外のプラットフォームとのデータ互換も原理的に可能である。本システムが適応可能なプラットフォームの条件としては、GSCを受け付けるプローブセットが用意されていること、および用量相関性が確保されていることの2点を満たしている必要がある(現在、2社検討開発中)。

VI. 形質非依存型トキシコゲノミクスへの適用

創薬開発促進のためのトキシコゲノミクス・プロジェクトと、化学物質の安全性評価のためのプロジェクトの2つが現在、Percellomeシステムのもとで進行中である(表1)。両プロジェクトではともに、4~5段階の用量について4時点

表1. 厚生労働省におけるトキシコゲノミクス研究

プロジェクト名	「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究」 (厚生労働科学研究費補助金、萌芽的先端医療技術推進研究事業) H14年度～5年計画	「化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究」 (厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業) H15年度～3年計画
組織	創薬関連企業17社参加「産学官連携」プロジェクト [プロジェクトリーダー：長尾 拓 (国立衛研所長)]	研究班体制の研究プロジェクト 国立衛研・安全性生物試験研究センター内 (主任研究者：菅野 純)
目標	創薬過程における安全性の早期予測システムの構築	国が行う既存化学物質の点検を、より迅速、安価かつ正確に実施する毒性予測システムの構築
期待される効果	医薬品による副作用の早期予測による、臨床段階での開発中止の回避、創薬の経費削減と効率化の促進 予期せぬ副作用の低減による国民被害の減少、より安全性の高い医薬品の創製による製薬企業の活性化と国民の健康増進への寄与	日常生活において使用される数万種の化学物質の毒性を、従来の毒性試験よりも、迅速、安価かつ網羅的に予測することによる国民の安全・安心の向上 毒性発現メカニズムに支えられた包括的な毒性評価の体制の整備
検討物質	開発中止、あるいは販売中止となった医薬品・医薬品候補物質を中心としたDrug-likeな化合物 (150物質/5年)	日常使用される数万種に及ぶ化学物質を中心とした各種の物質 (約90物質/3年)
モデル動物	ラット (医薬品の審査に使用されるSD/IGSラット)	マウス (遺伝子改変マウスの活用を見越しC57BL/6マウス)
検索臓器	肝および腎、ヒトおよびラット肝細胞由来培養細胞	肝および化学物質固有の標的臓器



での遺伝子発現を観測する16～20群 (1群3匹) の構成から成るプロトコルを採用した。1つの化合物について48～60匹の動物からのサンプルを解析しPercellomeデータを生成する。遺伝子の発現値を3次元表示することでその用量・時間依存性が視覚化できる。X軸に時間、Y軸に用量、Z軸に発現量 (ゼロからの均等目盛り表示) をプロットすることにより、1つの遺伝子につき16～20格子点 (48～60枚の

図8. トキシコゲノミクス・プロジェクトにおける単回投与実験の基本構成

時間と用量の組み合わせから成る4×4～4×5のマトリクス構造のプロトコルにてデータを生成中である。各群3匹とし、サンプルはプールせず個別にGeneChip解析を実施している。X軸に時間、Y軸に用量、Z軸に発現量 (ゼロからの均等目盛り表示) をプロットすることにより、1つの遺伝子につき1枚の局面を描くことができる。現在使用中のMOE430v2は約45,000のプロブセット情報を生成するため、1つの化合物のトランスクリプトーム情報は45,000枚の局面の集合体 (ミルフィーユ・データ) で表される。

GeneChipからのデータ) から成る1枚の局面を描くことができる (図8)。1つのGeneChipが45,000のプロブセットから成る場合、1つの化合物の用量・時間依存的データ3次元表示では45,000枚の局面の層状集合体から成る (ミルフィーユ・データと名付けた)。このミルフィーユ・データは各格子点が3匹の動物に由来する3つのデータをもとにしており、格子点のデータの信頼性の評価を含めて、アーチファクトの除去や、生物学的な蓋然性のある変化であるか否かの判別に適しているうえに、類似の用量・時間反応を示す遺伝子の選別に威力を発揮する。

VII. 形質非依存型トキシコゲノミクスにおけるデータ解析法

創薬開発促進のためのトキシコゲノミクス・プロジェクト

トでは、特に開発中止となった化合物を含む薬剤関連の化学物質を中心としてラットを用いた実験を進めており、すでに蓄積されている膨大なラット毒性情報との対比に重点を置いた解析を(株)日立製作所とともに進めている。他方、筆者らが進めている化学物質の安全性評価のためのプロジェクトにおいては、一般的な化学物質が対象であるため毒性データが必ずしも豊富でないこともあり、生体反応の分子メカニズム解析(カスケード解析)に重点を置き、遺伝子欠失動物の活用を見込んで、マウスを用いた実験を重ねている。こちらでは遺伝子発現プロファイルを体系化するために形質発現情報に頼らず、完全な教師なしクラスタリングを実施する。ミルフィーユ・データを基礎に、生物学者が視覚的に確認できる変数を利用する方法をNTTコムウェア(株)と共同開発し、Teradata〔日本NCR(株)〕による解析・データベース上に搭載した。このクラスタリング手法は、クラスター数およびクラスター径を指定せず、通常45,000プローブセット(MOE430v2)を小さいものから順に数百クラスターに分類する。今後この方法と、適切な遺伝子欠失マウスによるミルフィーユ・データ生成により、客観的な遺伝子カスケード構築を進める。そのうえで、既知の情報との比較を行い、必要に応じて確認のための小実験を別途追加して実施し、最終的に信頼性の高い遺伝子カスケードデータベースの構築と、これに基づいた効率的で正確な毒性評価・予測技術の開発を目指している。

おわりに

毒性学は毒性という形質発現をもとに成り立ってきているが、その効率化と正確性向上のために分子毒性学的なメカニズム解析の導入を図るに当たり、形質が発現する以前の段階、あるいはフィードバック機構が働くために形質発現が乏しい状態など、形質発現を直接には伴わないところでの遺伝子発現変動を網羅的に捕らえて毒性に関わる遺伝子発現カスケードの全容を解明する必要に迫られている。これに応えるために、筆者らは形質非依存型トキシコゲノミクスの概念の導入と、それに必要な技術であるマイクロアレイから細胞1個当たりのmRNA絶対量情報を生成する

Percellomeシステムを開発した。

絶対量化されたPercellomeデータは、そのすべてを生物学者にとってわかりやすい3次元ミルフィーユ・データとして表示することが可能であり、その結果、クラスター化などのデータ解析過程を生物学的蓋然性に基づいて比較的容易に検証することができるようになった。本システムは4×4~4×5マトリックス方式の大型プロジェクトを対象として開発したものであるが、実際には小規模の実験サンプルに対しても有用性が高いことが実証されている。特に変動遺伝子リストの遺伝子数が飛躍的に増大することが多い。それは、変動比率による足切りやハズレ値計算のような統計手法を用いる必要がなく、個々の遺伝子について逐一比較ができるためである。

絶対量化された発現値はコントロール群を含めてGeneChip間あるいは実験間でそのままの形で相互に直接比較が可能であり、例えば日内変動遺伝子そのままミルフィーユ・データとして表示されている。さらに、異なったバージョン間、定量PCRとの間、さらにはアフィメトリクス以外のPercellomeに対応したプラットフォームとの間でのデータ変換のための変換関数を導き出すことが可能であり、この特徴は複数の研究者や組織がデータを持ち寄るデータベースの構築に貢献する可能性が期待される。

以上、Percellomeシステムはミルフィーユ・データと相まってトランスクリプトームの精度と相互交換性を有意に高めることが示唆されつつある。現在まで創薬プロジェクトも当方の化学物質プロジェクトも4×4ないし4×5マトリックス規模の実験を30~40化合物程度実施し、膨大なデータの蓄積を開始した。今後、この形態のデータの有用性を客観的に評価頂くためのPercellomeコンソーシアムの構築を考えていきたい。

謝辞 本システムの開発とプロジェクトの遂行は、当毒性部の諸先生方および安東朋子、森山紀子、近藤優子、中村祐子、安部麻紀、吉木健太、松田菜恵、森田絃一、今井あや子の各氏の強力なサポートに負っておりここに深く感謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ-001およびH15-化学-002による。

文献

- 1) Waters MD, et al: *Mutat Res* (2003) 544: 415-424
- 2) Hill AA, et al: *Genome Biol* (2001) 2: RESEARCH0055
- 3) van de Peppel J, et al: *EMBO Rep* (2003) 4: 387-393
- 4) Hekstra D, et al: *Nucleic Acids Res* (2003) 31: 1962-1968
- 5) Sterrenburg E, et al: *Nucleic Acids Res* (2002) 30: e116
- 6) Talaat AM, et al: *Nucleic Acids Res* (2002) 30: e104
- 7) Bolstad BM, et al: *Bioinformatics* (2003) 19: 185-193
- 8) Lee PD, et al: *Genome Res* (2002) 12: 292-297
- 9) Wilson M, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96: 12833-12838
- 10) Heller RA, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94: 2150-2155

月刊 薬事

The Pharmaceuticals Monthly

別 刷

じほう

医薬品開発における わが国のトキシコゲノミクスの取り組み

菅野 純

KANNO Jun

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター毒性部部长

はじめに

ヒトやマウスなどの全ゲノムが解読されたことを受け、解読されたゲノム情報をもとに、遺伝子機能の解析と、それら遺伝子の発現状況が一挙に把握できるようなマイクロアレイなどの技術の普及が加速している。こうした状況から「全遺伝子発現プロファイリング」を、われわれや実験動物の体内で起こっている分子レベルのできごとを解明する一つの手段として利用することが可能となった。

この際のプロファイリングの特徴は、形質発現を必ずしも必要としないことにある。すなわち、従来のプロファイリングは、ある所見が存在し、それを引き起こした原因と考えられる遺伝子発現を追いかける方法を採用してきた。ここでは、全遺伝子をモニターするため、明瞭な形質発現が見られないような場合でも、プロファイリングに必要な情報が収集できる。

このような、形質発現に依存しないアプローチを毒性学に当てはめると、形質非依存型トキシコゲノミクスとすることができる。将来的な予測毒性学は、この形質非依存型と従来からの形質依存型の両方によって形成される、バランスのよいインフォマティクスにその基礎を置くことになる。

現在、創薬開発促進のためのトキシコゲノミクス・プロジェクトと、化学物質の安全性評価のためのプロジェクトの2つが、発現値絶対量化システムの下で進行中である(表1)。

トキシコゲノミクスと安全性評価予測

毒性学では、外来性の因子により生体に引き起こされる種々の形質発現を観察、類型化することになり、それに対して原因物質を分類する作業がなされてきた。これらの手法は形質発現に依存しており、もしも処置や遺伝子型に関連した形質発現が認められない場合には、そのメカニズム解析や責任遺伝子の探索などが困難になることが多い。

しかし例えば、恒常性維持機構を対象とする「毒性」を考慮したとき、化合物投与などによる刺激が「毒性所見」を明確に誘発する以前の段階から、何らかの生体機構が防御反応として分子レベルで作動していることは明らかである。このような段階における生体反応をモニターするためには、シグナルそのもの、あるいはシグナルによって引き起こされる蛋白修飾、遺伝子発現調節、蛋白発現などを経時的・用量依存的に観測する必要がある。

現時点で利用可能な技術のうち、定量性、再現

表 1 絶対量化手法を用いた2つのプロジェクト

プロジェクト名	「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究」 (厚生労働科学研究費補助金、萌芽の先端医療技術推進研究事業) 平成14年度～5年計画	「化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究」 (厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業) 平成15年度～3年計画
組織	製薬関連企業17社参加「産学官連携」プロジェクト (プロジェクトリーダー: 長尾拓・国立衛研所長)	研究班体制の研究プロジェクト 国立衛研・安全性生物試験研究センター内 (主任研究者: 菅野純)
目標	創薬過程における安全性の早期予測システムの構築	国が行う既存化学物質の点検を、より迅速、安価かつ正確に実施する毒性予測システムの構築
期待される効果	医薬品副作用の早期予測 臨床段階での開発中止回避 創薬の経費削減と効率化の促進 製薬企業の活性化と国民の健康増進	日常生活において使用される数万種の化学物質の毒性の迅速、安価かつ網羅的な予測 国民の安全・安心の向上 包括的な毒性評価の体制の整備
検討物質	開発中止、あるいは販売中止となった医薬品・医薬品候補物質を中心としたDrug-likeな化合物(150物質/5年)	日常使用される数万種に及ぶ化学物質を中心とした各種の物質(約90物質/3年)
モデル動物	ラット (医薬品の審査に使用されるSD/IGSラット)	マウス (遺伝子改変マウスの活用を見越しC57BL/6マウス)
検索臓器	肝および腎。ヒトおよびラット肝細胞由来培養細胞	肝および化学物質固有の標的臓器

性およびハイスループット性からは、DNAマイクロアレイを用いたmRNA発現変動モニタリングがこの目的に最適であると考えられる。

われわれはマイクロアレイを使用するにあたり、「細胞1個当たりのmRNA発現量」の概念を導入した発現値絶対量化システム (Percellome) を開発した。この方法を用いることで、遺伝子発現データを対照に対する比率 (例えば、log-ratio) として取り扱う必要がなくなり、個々の遺伝子の発現データを赤血球数や血糖値のように、ゼロを原点にした「値」として扱うことが可能となった。その結果、例えばマイクロアレイ上に用意された全遺伝子のデータを無駄なく活用することが可能となるなどの利点が生じ、データの精度が著しく向上するものと期待される。

この方法は、製薬関連企業17社と国立医薬品食品衛生研究所が共同研究の形でIGSラットを用い

て進行中の、創薬過程における安全性予測システム開発プロジェクト「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究」(プロジェクトリーダー: 長尾拓・国立衛研所長) の基本プロトコールに採用されている。

医薬品開発のトキシコゲノミクス

網羅的遺伝子発現プロファイリングをもとにしたインフォマティクス技術の構築により、創薬過程における安全性の予測システムを作成することが医薬品開発のトキシコゲノミクスの目的となる。

1) 創薬トキシコゲノミクスのデータベース構築

具体的には、少数の小型実験動物あるいは培養細胞系における遺伝子発現の網羅的なプロファイル生成により、検体物質の安全性を従来の毒性試験よりも正確に、かつ詳細に予測するシステムの開発を目指す。これは、企業参加を得て、国立衛研を核とした「産学官連携」の形態を取る大規模プロジェクト（プロジェクトリーダー：長尾）として、この目的の達成のために、「発現解析データ生成部門」、「データベース・インフォマティクス部門」、「データ・システム精度管理部門」、「病理・毒性評価部門」、および「知的財産・総務部門」を設け、平成14年度より始動している。

創薬トキシコゲノミクスのデータベース構築の第一段階では、過去の問題例と類似したプロファイルを示す化合物を識別するサービスを提供することになると思われる。途中で開発が中止されたような化学物質を参加17社がプロジェクトに提供することになっており、これらの化合物が示す遺伝子発現プロファイルには、メカニズム解析が完了していない段階においても、フィンガープリントとしてのインフォマティクスの意義があると考えられる。少なくとも、提供された中止化合物を手本としたスクリーニング手段としての役割を果たすものと期待される。

第二段階では、肝毒性や腎毒性といった特徴的毒性反応について、その典型的な毒性パターンとリンクするプロファイルが抽出されてくることが予想される。例えば、小葉中心性壊死と関連するプロファイル、脂肪肝と関連するプロファイルなどが整理されてくると考えられる。この段階で、既知の毒性を効率よく言い当てるような遺伝子群が抽出される可能性がある。これらに基づいて、ある特定の化学物質のプロファイリングから、ある特定の毒性発現パターンが予測されるようになるかもしれない。

ここまでの段階では、お手本とした化合物によく類似した化合物の分類が可能となる。この段階でデータベースの守備範囲を広く確保するためには、それ相当の種類化合物について発現プロファイルとその毒性発現情報の両方を揃えることが必要になるが、この段階では、詳細な分子毒性的なメカニズム情報は必ずしも必須ではない。

2) 分子毒性的メカニズムのデータベース構築

これに対し、次の段階では遺伝子発現カスケード解析を含む分子毒性的メカニズムのデータベースの構築が考慮される。上記のプロジェクトに1年遅れてスタートした「化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究」においては、この点を主眼にしているところである。

これを創薬トキシコゲノミクスに当てはめると、以下のようなことが考えられる。

医薬品の開発過程との関連においては、網羅的トランスクリプトームによる薬効ゲノミクス解析と毒性ゲノミクス解析とがコインの裏表の関係になることが予想される。すなわち、ファーマコゲノミクスにおいて薬効に関わる遺伝子発現情報が網羅的に得られれば、その生命体内で同時に誘発される毒性発現事象の情報をすでに多少なりとも含んでいるはずであるからである。実験プロトコルが毒性解析に最適ではない場合もあり得るが、コインの裏表を積極的に一括して検討しようとすれば、両面に適した実験プロトコルを採用することも可能であろう。薬効と毒性の解析が共通のゲノミクスデータベースインフォマティクスの表裏の関係となったあかつきには、テーラーメイド医療の推進にも、この解析アプローチが有効となることが考えられる。

例えば、「特定のSNPsをもった人にあわせた薬効をもつ医薬品の開発」、より消極的には「毒性

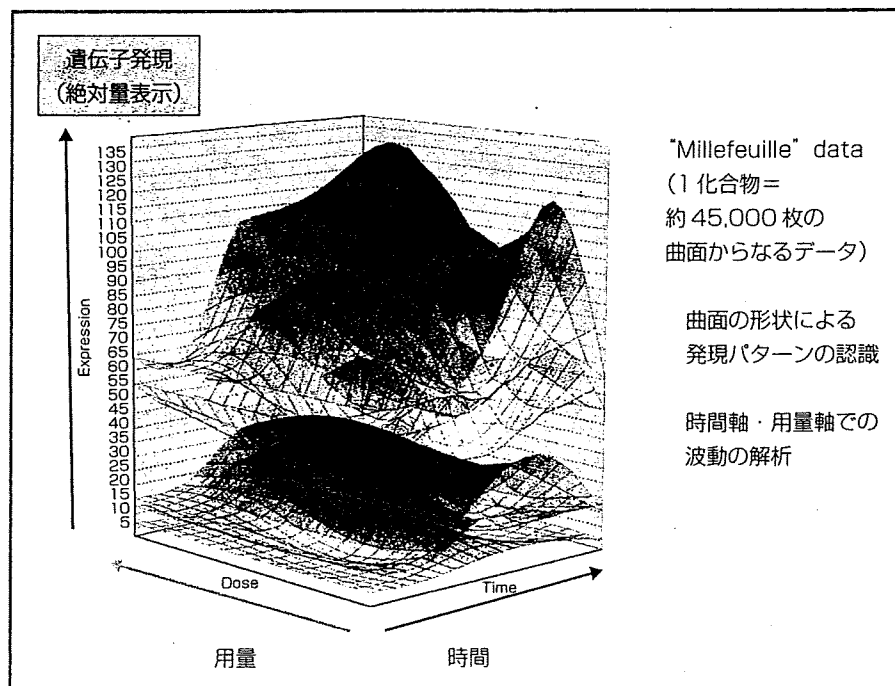


図1 PercellomeによるMillefeuille data

が強く出るタイプのSNPsをもった人への投与を差し控える」、あるいは「薬の効かないSNPsをもった人にはその薬を無駄に投与しない」といったことがその命題であろう。前者に対しては、薬効に関わる遺伝子カスケードが正確に把握されることにより、開発当初の薬効標的分子だけでなく、その周辺の新たな標的部位が開拓され、創薬標的の設定自由度を増すことで多様なSNPsへの対応の可能性が指摘されている。後者に対しては、毒性発現カスケードとSNPsの関係を明らかにすることができれば、それを回避する方策、あるいは薬が効かない理由が明らかになる可能性が考えられる。

形質非依存型トキシコゲノミクスにおけるデータ解析法

創薬開発促進のためのトキシコゲノミクスプロジェクトでは、前述のように、特に開発中止となった化合物を含む薬剤関連の化学物質を中心と

してラットを用いた実験を進めており（現在まで約40化合物）、すでに蓄積されている膨大なラット毒性情報との対比に重点を置いた解析を日立製作所とともに推し進めている。

一方、化学物質の安全性評価のためのトキシコゲノミクスプロジェクトにおいては、一般的な化学物質が対象であるために毒性データが必ずしも豊富でないこともあり、生体反応の分子メカニズム解析（カスケード解析）に重点を置き、さらに遺伝子欠失動物の活用を見込んで、マウスを用いた実験を重ねている。こちらでは遺伝子発現プロファイルを体系化するために形質発現情報に頼らず、完全な「教師無しクラスタリング」を実施する。Percellomeによる絶対量化データをMillefeuille dataの形に表現する方法（図1）を基礎に、生物学者が視覚的に確認できる変数を利用する方法をNTTコムウェアと共同開発し、Teradata（日本NCR）による解析・データベース上に搭載した。このクラスタリング手法は、クラスター数およびクラスター径を指定せず、通常45,000ブ

ローブセット (MOE430v2) を小さいものから順に数百クラスターに分類する。

今後、この方法と適切な遺伝子欠失マウスによるデータを活用し、客観的な遺伝子カスケード構築を進め、そのうえで既知の情報との比較を行い、必要に応じて確認のための小実験を追加して実施し、最終的に信頼性の高い遺伝子カスケードデータベースの構築と、これに基づいた効率的で正確な毒性評価・予測技術の開発をめざしている。

まとめ

毒性発現と投与した化学物質の連関性の上に成り立つ毒性学に、効率化と正確性向上のために分子毒性学的なメカニズム解析の導入を図るにあたり、

遺伝子発現変動を網羅的に捕らえて毒性に関わる遺伝子発現カスケードの全容を解明する必要性が増してきていると考えられる。これに応えるために、われわれは形質非依存型トキシコゲノミクスの概念の導入と、それに必要な技術であるマイクロアレイから細胞1個当たりのmRNA絶対量情報を生成するPercellomeシステムを開発した。

分子毒性学として遺伝子発現カスケード解析が進んだ段階では、医薬品の開発過程における薬効ゲノミクス解析と毒性ゲノミクス解析とがコインの裏表の関係になることが予想される。そして、毒性予測の向上による開発中止事例の回避がもたらす経済的・時間的損失の軽減のみならず、創薬標的自由度の増加によるテーラーメイド医療の推進などの面からも医療の向上に貢献するようになると期待される。

日刊薬業

高齢化、技術革新、国際化といった流れは医薬品産業に大きな変革をもたらそうとしています。「日刊薬業」は、その動きを簡潔・迅速にお伝えいたします。

大きな変動が予想される医療・薬価制度改革、加速する医薬品メーカー・卸業界の再編成、国際的規模での開発競争激化、新薬承認迅速化など、医薬品産業を取り巻く環境は、さらに激変の度を増しています。日刊薬業は電子メール速報版「日刊薬業メールサービス」とともに、これらの動向を迅速に提供しています。また、情報の総合的な理解を助けるため、定期的に解説の頁を加えております。医薬品産業の現在と未来を見通すためには欠くことのできない情報紙です。

- ◇行政=厚生労働省をはじめ医療・保健・福祉関連全省庁、地方庁取材も充実。
- ◇国会
- ◇医療施設=病院・診療所、老人保健施設、在宅。
- ◇薬局・薬店
- ◇産業・流通=医薬品産業・流通をはじめ医療関連産業・流通の全域。
- ◇団体=医療、保険、産業の各種団体。
- ◇海外情報=欧米・アジアを中心に高い速報性

発行：月～金曜日
 判形：B5判 縦組み
 購読料：1年83,160円、6か月46,410円
 (税込み価格/送料当社負担)

JiHO 株式会社 じほう 無料試読・購読のお申込みは<http://www.jiho.co.jp>へ。

化学物質の毒性

KANNO Jun

菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

毒性は、化学物質と生体の種々の構成分子との相互作用の結果として発現する。酵素阻害の様な直接的な相互作用の他、生体の機能を調節しているシグナルの攪乱などの間接的な機序によっても引き起こされる。それらが、同時に複数箇所で行われるのが普通であり、その複雑な全容の解明には現在の毒性学はまだ到達していない。そこで、化学物質が引き起こす生体反応を現象として、ヒトの身代わりとしての実験動物を用いて観測し、その毒性の評価を実施している。ここでは、それに纏わる四方山話として生物側からの私見を述べる。

胃や腸などの消化管は、無数の腺管の集まりからできている(図1)。これらの一つに遺伝子異常が起きて、異常な増殖(周囲との協調を欠くようになる)を始めると、それが腫瘍の始まりである。周囲を圧排するだけで浸潤や転移を起こさない腫瘍を良性腫瘍(消化管の場合腺腫)と呼び、そうではなくて、放置すれば浸潤・転移により死を招くものを悪性腫瘍(腺癌)と呼ぶ慣わしがある。さて、ひとつの腺管から段々と病変が進行してゆく過程を想像してみると、ごく初期の段階では、たとえそれが腺癌であっても浸

潤や転移を起こす前の状態が存在すると考えられる。すなわち、粘膜層内に留まった段階の粘膜内癌という病変が定義されるのである(図2)。病変を構成する腺管が明らかに悪性の腺癌の所見を示していたとしても、粘膜内に留まっていれば、転移を起こしている確率は事実上ゼロであることが知られている。よって、その様な病変は単純に切除する(良性腫瘍を摘出するが如く、あるいは、リンパ節廓清や拡大切除をしないという意味である)ことで完治してしまう。欧米では、粘膜内癌を癌と呼ばずに、異型病巣と呼んで医療保険上も癌保険がおりない。日本でも大腸のポリープ癌などは、これに倣って癌保険はおりなくなっている(ただし、欧米でも、印鑑細胞癌だけは粘膜層内に留まっても癌と呼ぶ(図3)。この癌は、腺管を作らない単細胞から成る癌であり、粘膜層内に留まっても転移することがあるとの理由による)。さて、異型病巣は良性か? 放置すれば必ず浸潤と転移を引き起こし患者は死ぬ。故に、悪性である。顕微鏡で局所だけを見た場合、異型病巣も浸潤癌も区別がつかない。他方、良性の腺腫(ポリープ

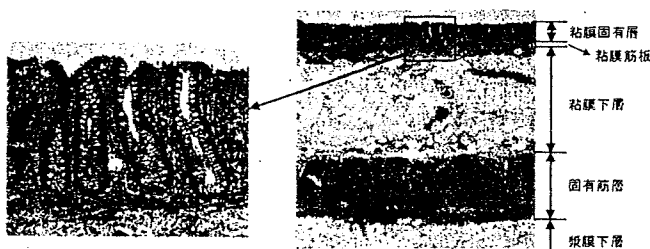


図1 ヒト大腸の構造。粘膜固有層の厚さが約2mm、固有筋層(腸の蠕動を起こす)は約5mmである。粘膜は拡大図で見るように枝分かれしない一本の腺管が並んだものである。



図2 粘膜層内に留まった段階の粘膜内癌。▲の部分の腺管は不規則に分岐し、それを構成する細胞の形態も異常である。

*は粘膜筋板であり、本病変は粘膜内にあることがわかる。

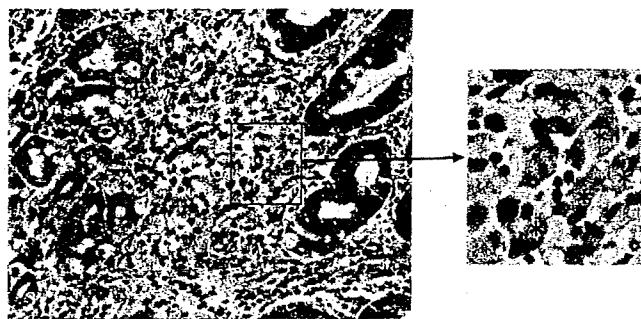


図3 ヒトの胃の印鑑細胞癌。中央部分に見られる淡紅色の細胞群は一つ一つがばらばらに増殖する癌細胞である。右はその拡大。*は全て癌細胞である。



図4 ヒト大腸のポリープで、良性の腺腫である。

は、直径が1センチを超え、大きくなる場合もあるが、粘膜下に浸潤することは無く、転移もしない(図4)。ただし、大きな腺腫では、その一部が癌化して、その成分が浸潤・転移を来す場合が知られている。

ひとつの腺管に異常が発生した最初の段階から悪性の場合と、最初は良性であっても病変が成長するにつれて次第に悪性化が進んでいく場合の二通りがあるようである。翻って、良性・悪性の境目はどこに設定するのがよいのであろうか。癌の「真の判定」というものは存在するのであろうか。この問題は現実的には「何のために、あるいは誰のために」判定するかに依存する。例えば、患者のためには、「局所を単純切除すれば完治する病変は良性である(放置しておけば癌で死ぬ場合でも)」という基準が良いと考える立場がある。保険会社は、「良性腫瘍と同じ取り扱いで完治する病変は、何であろうと癌ではない」という判定を好むであろう(保険料が、その分安く据え置かれるのであれば利用者にとってもよい事かもしれない)。科学的には「真実を正直に記載する」のが良いとする立場がある。特に、癌の特性解明を目指す研究者の立場からは、これが必須であると考えてであろう。ここで言いたいのは、診断の基準はその目的によって変わり得るということである。

インスリンは、膵臓のランゲルハンス島(図5)で合成され、血液中に放出されるホルモンである。血液中のブドウ糖を細胞内に取り入れる機能を促進的に調節している。これが、何らかの原因で欠乏した場合、高血糖となり、糖尿が出る。体中の細胞にはブドウ糖が取り込まれないため、細胞はエネルギー不足となり、特に脳細胞は機能を停止し(糖尿病性昏睡)、さらに死に始めることがある(脳死となる)。自前でインスリンを作れなくなってしまった患者(1型糖尿病、インスリン依存型糖尿病(IDDM))には、治療薬としてインスリンの投与が必要である。投与量が足りなければ、高血糖、昏睡となる。インシュリンが多すぎれば、今度は血糖値が異常に低下して脳に必要なブドウ糖が行き渡らないために昏睡となり、量によっては死亡する。毒性学の開祖とも言われる16世紀のパラケルスス(Paracelsus)という錬金術師、医者(あるいは何でも屋?)の言葉、「すべての物質が有害である。有害でない物質は

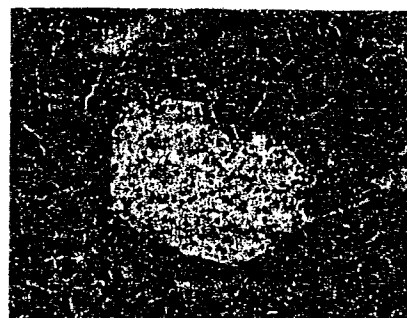


図5 ラット膵臓のランゲルハンス島：中央の色の淡い細胞の集団がランゲルハンス島(*)である。周囲の色の濃い細胞は膵液を作る細胞(腺房)である。

なく、用量によって毒であるか薬であるかが決まる」は有名である。インスリンも量が超せば毒である。砒素は、昔から暗殺に用いられてきた。現在においては、極く少量がある種の白血病の治療に効果的であるといわれる。フグ毒の成分であるテトロドトキシンは毒矢にも使われる運動神経麻痺物質で、多量では呼吸が止まり、死に至る。「てっちり鍋」で摂取する程度の微量では「体が温まる」、すなわち抹消の血管拡張作用が前面に現れる。インシュリンの話は同じ作用が度を越せば有害である場合を示すが、後二者は低濃度では異なった内容の作用を現す場合を示している。すなわち、パラケルススの言葉は、「適量なら薬で、量が多ければ有害で、微量なら無害だ」という量の関係だけを行っているとは限らない。少なくとも、現代においては「量によって現れる作用の内容もがらりと変わり得る」と読んだほうが正しい。

薬の開発の過程では、「臨床試験」なる「人体実験」が可能である。もちろん、人に使っても薬効のもたらす利益よりも副作用たる毒性が十分に小さいであろうことを、各種の動物実験によって確かめてから、厳重な管理体制の元で、且つ本人の了解を得た上で「人体実験」に入るわけである。この場合の毒性には、用量作用関係の概念が乏しい。すなわち、実際に薬として投与するときの薬用量において、どのような毒性(副作用)が現れるかが、最大の焦点なのである。この貴重な人体実験でわざわざ死に至るような大量投与を行うことは無い。また、薬効が期待できないような微量の投与も当然行わないわけである。

これに対して、いわゆる化学物質、たとえば、家庭用品、工業製品、食品添加物、などに関しては、人体実験が倫理的にも現実的にも出来ないと考えるのが通常である。ボランティアを募ることが出来れば、それは可能かもしれない。しかし、発癌性が疑われたり、蓄積性が高いもの(ダイオキシンやPCBのようなもの)などは、いくらボランティアが名乗り出ても投与させてもらう気にはならないものである。なお、薬でも人体実験が事実上出来ない対象がある。それは、胎児と子供である。人体実験が事実上